

**Disclaimer:**

This English translation is produced by machine translation and may contain errors. The JPO, the INPIT, and those who drafted this document in the original language are not responsible for the result of the translation.

**Notes:**

1. Untranslatable words are replaced with asterisks (\*\*\*\*).
2. Texts in the figures are not translated and shown as it is.

Translated: 05:11:21 JST 02/02/2008

Dictionary: Last updated 01/18/2008 / Priority:

---

## FULL CONTENTS

---

### [Claim(s)]

#### [Claim 1]

The inspection method of the periodontosis characterized by measuring gamma-guru TAMIRU transformer peptidase activity contained in gingival-sulcus exudation liquid.

#### [Claim 2]

The inspection diagnostic reagent of the periodontosis which contains gamma-guru TAMIRU transformer peptidase and the substance which reacts at least.

---

### [Detailed Description of the Invention]

#### [0001]

##### [Field of the Invention]

This invention relates to the inspection method and inspection diagnostic product of periodontosis. It is related with the biochemical inspection method of periodontosis and the inspection reagent of periodontosis which use gamma-guru TAMIRU transformer peptidase as a marker in detail.

#### [0002]

##### [Description of the Prior Art]

Periodontosis is chronic illness by which dental surrounding periodontal tissue is destroyed gradually. Generally except for the tumor which root tip nature periodontosis and periodontal tissue were able to do, the illness concerning the other periodontal tissue is collectively called periodontosis (or periodontal disease).

#### [0003]

There is knowledge that 80% aged 60 and over is periodontosis now, and it is predicted that patient load will increase with advance of aging from now on. Middle-aged patients also increase in number, it assumes the aspect of a folk disease, and the patient who is treated in the medical institution is considered that more than the same number exists as for 30 million or more people and a potential patient now, and the medical expenses of periodontosis amount to about 500 billion yen, and are equivalent to twenty percent of dental care expense in recent years.

#### [0004]

The cause of periodontosis is clarified about that they are bacteria, the advance process of condition, etc.

by the research by the present. It is mentioned that gum becomes swollen, or bleed from gum when brushing the time of a meal and one's teeth, or bad breath increases, or pus will come out from the surroundings of a tooth as a condition of periodontosis if gum is pushed. But since almost all periodontosis passes calmly as there are no subjective symptoms, such as a pain, when you have noticed unusually [ that a tooth is shaky etc. ], it is already in the state of too late, and also when most alveolar bones supporting a tooth are lost, there is not. [ little ]

[0005]

Moreover, although periodontosis reaches an advanced stage slowly, it has periodicity, a crack (generally called a "periodontal pocket".) arises between a tooth and gum, further, dental surrounding connective tissue is destroyed by the stationary phase which hardly shows condition, the intense acute inflammation which continues after that, and destruction, and an alveolar bone is absorbed. If it observes from the outside, gum will become thin and \*\*\*\*, a root will come to appear, a tooth will be shaky soon, and, finally a tooth will fall out.

[0006]

As the inspection diagnostic method of the periodontosis which has spread here now, The method of taking an X-ray and judging the degree of bony absorption visually, the method of measuring the depth of a periodontal pocket, and a bacterial adhesion level, Moreover, there are a method of investigating the degree of rocking of the bleeding at the time of probing (is there any bleeding or not when an instrument called a probe is put into a periodontal pocket?), or a tooth, a method of measuring the number of bacteria in a plaque (dental plaque), and identifying the kind of bacillus, etc.

[0007]

Moreover, the sample extracted from the mouth is made to react with the ground substance for alkali phosphatase activity measurement as a periodontosis inspection method using enzyme activity measurement, and the grade of the coloring is observed with the naked eye, The method (refer to patent documents 1) of predicting the grade of periodontal diseases, such as gingivitis and periodontosis, the method (refer to patent documents 2) of measuring the enzyme activity of KORAGENAZE contained in gingival-sulcus exudation liquid, etc. are proposed.

[0008]

[Patent documents 1]

JP,H5-176796,A.

[Patent documents 2]

JP,S61-71000,A.

[0009]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]

However, even if it had grasped the onset of periodontosis in the inspection diagnostic method of the conventional periodontosis shown above, it was difficult to predict a sick advance exactly. For this reason, development of the leading inspection method which can predict advance of periodontosis objective is still desired.

[0010]

The early detection of development of symptoms and especially sick advance prediction are important for the measure against the periodontosis which reaches an advanced stage as there are no subjective symptoms. If the grade of destruction of an alveolar bone can be predicted in early stages of inflammation (i.e., if the early checkup of alveolar bone destruction can be performed), the measure for

a patient's early treatment can be urged and exact medical treatment of periodontosis can be performed.  
[0011]

[ then, the grade of alveolar bone destruction of generating this invention in connection with periodontosis inflammations ] It grasps by investigating the activity of enzyme with the activity which carries out specialization guidance of the osteoclast, i.e., gamma-guru TAMIRU transformer peptidase, and aims at offering the inspection method and inspection diagnostic product of periodontosis which can perform advance prediction of periodontosis exactly.

[0012]

[Means for Solving the Problem]

In order to attain the above-mentioned purpose and to solve a technical technical problem, the following means are adopted in this invention.

[0013]

First, at this invention, invention-in-this-application persons are gamma-guru TAMIRU transformer peptidase enzymes (popular name.) to a periodontosis patient's gingival-sulcus exudation liquid. It calls for short the following "gamma-GTP". Based on having found out newly the fact of being discovered, the inspection method of the periodontosis which measures the activity of this gamma-GTP is offered.

[0014]

[ in addition, gingival-sulcus exudation liquid (gingival crevicular fluid) ] If inflammation happens to gum, it will be known that the amount of outflows will increase, and gamma-GTP is known as enzyme which transfers gamma-guru TAMIRU machine to other amino acid and peptide while hydrolyzing gamma-guru TAMIRU peptide including GURUTA thione.

[0015]

[ gamma-GTP used as an inspection marker in this invention ] The gamma-GTP activity measurement method generally used by inspection diagnosis of liver disease etc. now, The direct detecting method which utilized the reaction of a \*\* gamma-GTP antibody (antibody specifically combined with gamma-GTP), and gamma-GTP protein, Or it is possible to detect simply and certainly based on the well-known technique chosen from the method of checking discovery of mRNA which carries out the code of gamma-GTP etc. by the PCR (polymerase chain reaction: enzymes-for-synthesis chain reaction) method. That is, there is an advantage simply and that detection or measurement of gamma-GTP can be ensured with the established well-known means.

[0016]

Moreover, in this invention, the inspection diagnostic reagent of the periodontosis which contains gamma-GTP and the substance which reacts at least is offered.

[0017]

Gamma-GTP and the substance which reacts are \*\* gamma-GTP antibodies (antibody specifically combined with gamma-GTP), for example. It becomes possible to check that it is simple and promptly discovery of gamma-GTP which serves as a marker of the alveolar bone destruction (specialization guidance of an osteoclast) which advances according to the inflammation accompanying periodontosis advance by this. In addition, the diagnosis kit only for inspection diagnosis of periodontosis equipped with said inspection diagnostic product can also be offered.

[0018]

as mentioned above, the 1st technical meaning that the biochemical inspection diagnostic technique of the periodontosis in which inspection of periodontosis, diagnosis, and advance prediction are possible

can be offered if gamma-GTP is used as a marker of periodontosis -- and Since the measuring method or the detection method of gamma-GTP has the technology already established in the medical field etc., it has the 2nd technical meaning that the biochemical inspection diagnostic method of periodontosis can be spread through the medical field easily and quickly.

[0019]

[Example]

First, it is a suitable work example of the inspection method of the periodontosis concerning this invention, A periodontosis patient's gingival-sulcus exudation liquid can be extracted from a patient, and the method of checking the activity of gamma-GTP in this gingival-sulcus exudation liquid by the well-known gamma-GTP activity measurement method generally used by inspection diagnosis of the present liver disease etc., for example can be mentioned.

[0020]

When this measured value is high, inspection and diagnosis that it is a periodontosis disease can be performed. In addition, for example the principle of a gamma-GTP activity measurement method can use N-(DL-gamma-glutamyl) aniline (I) as a ground substance, can add amino acid (II) as an acceptor, can be said to \*\*\*\* the azo pigment of a reaction product, and can be carried out, using a commercial kit suitably.

[0021]

moreover, the direct detecting method (the immunological technique) which used the specific antigen-antibody reaction of a \*\* gamma-GTP antibody and specific gamma-GTP protein since that from which protein differs might also exist in this invention even if gamma-GTP activity was the same, Discovery of this gamma-GTP protein can be checked directly, and the embodiment of ensuring inspection and diagnosis of periodontosis can also be adopted.

[0022]

Here, it is thought that gamma-GTP protein is suitable as a marker for periodontosis inspection of what is discovered in connection with the formation activity of an osteoclast or bone destruction. A \*\* gamma-GTP antibody is not limited in particular that what is necessary is just what is specifically combined with this gamma-GTP protein. Diagnosis of periodontosis can be ensured by detecting directly the specific gamma-GTP protein discovered specifically from a periodontosis patient.

[0023]

Furthermore, the well-known RT-PCR (polymerase chain reaction: enzymes-for-synthesis chain reaction) method Based on the method of checking the mRNA discovery which carries out the code of the gamma-GTP protein, discovery of gamma-GTP can be checked and the embodiment which performs inspection and diagnosis that it is a rheumatoid arthritis disease can also be adopted.

[0024]

In addition, also by methods other than the above, if it is the way gamma-GTP protein is certainly detectable, it is employable as one of the work examples of this invention. For example, as an immuno ASSEI method using an antibody, radio immuno ASSEI (RIA) and an immunoenzymatic technique (ELISA), the competitive immunoenzymatic technique (EIA) not using radioisotope, etc. can be mentioned. Moreover, detection of the gamma-GTP protein using biosensor equipment, such as a beer core, is also possible.

[0025]

Next, a reagent equipped with the composition which contains at least the \*\* gamma-GTP antibody

specifically combined with gamma-GTP, for example as a suitable embodiment of the inspection diagnostic reagent of the periodontosis concerning this invention can be considered. In addition, the-like form besides an ingredient of this reagent is interpreted widely, and a biosensor chip with the detection surface which equips RIGANDO with an inspection diagnostic kit equipped with this reagent, a \*\* gamma-GTP antibody, etc. further etc. can offer it.

[0026]

[Example(s) of Experiment]

I have \*\*\*\*\* which pulled out the tooth from ten periodontosis patients offered, and it puts into a tube, without washing this \*\*\*\*\*, a 1ml physiological saline (PBS) is put in so that \*\*\*\*\* may be immersed, it was neglected for 24 hours and 4 degrees C of gamma-GTP of periodontal tissue attached to said \*\*\*\*\* was made eluted. Then, the obtained elution liquid was filtered with the filter, it sterilized, and the elution liquid for measurement was obtained. The gamma-GTP activity in this elution liquid was measured using the Kyowa Medex, Inc make and a DETAMINA L (registered trademark) kit. In addition, this measurement used 60microl in said 1ml of elution liquid.

[0027]

In addition, the comparison sample had \*\*\*\*\* (sample number 11) from the cavity patient who is not periodontosis, and a healthy tooth, and measured gamma-GTP activity by the same method as the above, using respectively \*\*\*\*\* (sample numbers 12-14) which pulled out the tooth on the occasion of tooth reform. A measurement result is shown in the next table 1.

[0028]

[Table 1]

| 検 体        | $\gamma$ -G T P 活性 (U) |
|------------|------------------------|
| 1          | 9 . 8                  |
| 2          | 1 5 . 9                |
| 3          | 1 4 . 0                |
| 4          | 2 5 . 3                |
| 5          | 2 1 . 5                |
| 6          | 1 5 . 9                |
| 7          | 1 5 . 9                |
| 8          | 6 . 1                  |
| 9          | 4 4 . 0                |
| 1 0        | 1 0 . 6                |
| 1 1 (比較検体) | 0                      |
| 1 2 (比較検体) | 0                      |
| 1 3 (比較検体) | 0                      |
| 1 4 (比較検体) | 0 . 7                  |

[0029]

The gamma-GTP activity in the elution liquid of \*\*\*\*\* of ten patients (sample numbers 1-10) who showed the symptoms of periodontosis as shown in the above-mentioned table 1 highly (an average of 17.9U) On the other hand, set the gamma-GTP activity of the elution liquid (sample number 11) of

\*\*\*\*\* from the cavity patient who is not periodontosis in the elution liquid (sample numbers 12-14) of  
\*\*\*\*\* which was 0, and the tooth was healthy and pulled out the tooth on the occasion of tooth reform.  
\*\* and gamma-GTP activity were Averages 0.2U.

[0030]

In addition, in the above-mentioned example of an experiment, when the gamma-GTP activity contained in the saliva of ten patients who showed the symptoms of periodontosis was measured, it has checked that it was about abbreviation 1U. From this, the great portion of gamma-GTP in the elution liquid obtained from the sample numbers 1-10 has checked that it was a thing of gingival-sulcus exudation liquid origin.

[0031]

From the above experimental result, gamma-GTP was discovered in the gingival-sulcus exudation liquid of the patient who showed the symptoms of periodontosis, and since it was verifiable that the activity increases, the validity of this invention was able to be checked.

[0032]

This invention is alveolar bone destruction accompanying periodontosis inflammations. Since it is the inspection diagnostic reagent which can check discovery of the method of measuring the activity of gamma-GTP concerning specialization guidance of the osteoclast to advance, or \*\* gamma-GTP, it can use for grasp of the early detection of alveolar bone destruction, and the advance stage of alveolar bone destruction, and advance prediction of alveolar bone destruction.

[0033]

[Effect of the Invention]

By this invention, the completely new use as a marker of periodontosis can be proposed about gamma-GTP. And the measuring method or the detection method of gamma-GTP can spread easily and quickly the biochemical inspection method and inspection diagnostic reagent of periodontosis through the medical field using the technology already established in the medical field etc. Furthermore, since the decisive biochemical inspection diagnostic technology of periodontosis can be offered, it can use for the early checkup of periodontosis, and early treatment.

---

[Written Amendment]

[Filing Date] Heisei 15(2003) July 23 (2003. 7.23)

[Amendment 1]

[Document to be Amended] Description

[Item(s) to be Amended] 0023

[Method of Amendment] Change

[The contents of amendment]

[0023]

Furthermore, the well-known RT-PCR (polymerase chain reaction: enzymes-for-synthesis chain reaction) method Based on the method of checking the mRNA discovery which carries out the code of the gamma-GTP protein, discovery of gamma-GTP can be checked and the embodiment which performs inspection and diagnosis that it is periodontosis can also be adopted.

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-129584

(P2004-129584A)

(43) 公開日 平成16年4月30日(2004.4.30)

|                           |               |             |
|---------------------------|---------------|-------------|
| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | F 1           | テーマコード (参考) |
| C 1 2 Q 1/48              | C 1 2 Q 1/48  | 2 G 0 4 5   |
| G 0 1 N 33/50             | G 0 1 N 33/50 | 4 B 0 6 3   |

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 6 頁)

|           |                              |          |   |
|-----------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2002-298177 (P2002-298177) | (71) 出願人 | 301058137   |
| (22) 出願日  | 平成14年10月11日 (2002.10.11)     |          | 株式会社エーシーバイオテクノロジーズ                                |
|           |                              |          | 茨城県つくば市妻木210番地4                                   |
|           |                              | (74) 代理人 | 100112874   |
|           |                              |          | 弁理士 渡邊 薫  |
|           |                              | (72) 発明者 | 石塚 保行   |
|           |                              |          | 神奈川県川崎市麻生区虹ヶ丘1丁目11-3                              |
|           |                              | Fターム(参考) | 2G045 BB14 CB05 CB06 CB07 FB01<br>4B063 QA19 QQ03 |

(54) 【発明の名称】 歯周病の検査方法及び検査診断薬

(57) 【要約】

【課題】歯周病の進行予測を的確に行うことができる歯周病の検査方法及び検査診断薬を提供すること。

【解決手段】歯周病によって流出量が増加することが知られている歯肉溝 出液に発現することが判明した破骨細胞の分化誘導に参与するγ-グルタミルトランスペプチダーゼの活性を測定する歯周病の検査方法を提供するとともに、とともに、前記γ-グルタミルトランスペプチダーゼと反応する物質、例えば抗γ-GTP抗体を少なくとも含有する歯周病の検査診断試薬を提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

歯肉溝 出液に含まれるγ-グルタミルトランスペプチダーゼ活性を測定することを特徴とする歯周病の検査方法。

## 【請求項2】

γ-グルタミルトランスペプチダーゼと反応する物質を少なくとも含有する歯周病の検査診断試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、歯周病の検査方法及び検査診断薬に関する。より詳細には、γ-グルタミルトランスペプチダーゼをマーカーとする歯周病の生化学的な検査方法及び歯周病の検査試薬に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

歯周病は、歯のまわりの歯周組織が徐々に壊されていく慢性の病気である。一般には、根端性歯周炎や歯周組織にできた腫瘍を除いて、それ以外の歯周組織に係わる病気を一括して歯周病（又は歯周疾患）と呼んでいる。

## 【0003】

現在、60歳以上の80%が歯周病であるという知見があり、今後、高齢化の進行に伴い患者数が増大することが予測される。近年は、中年の患者も増加し、国民病の様相を呈し、現在、医療機関で治療を受けている患者は3,000万人以上、潜在患者も同数以上存在すると考えられ、歯周病の医療費は、約5,000億円に達し、歯科医療費の2割に相当する。

## 【0004】

現在までの研究によって、歯周病の原因が細菌であることや症状の進行過程等について明らかにされている。歯周病の症状としては、歯肉が腫れたり、食事の時や歯を磨く時に歯肉から出血したり、口臭が増したり、歯肉を押すと歯のまわりから膿が出たりすることが挙げられる。だが、殆どの歯周病は、痛み等の自覚症状がないままに静かに経過するため、歯がぐらつく等の異常に気付いた時には、既に手遅れの状態で、歯を支える歯槽骨の大半が失われている場合も少なくない。

## 【0005】

また、歯周病は、ゆっくり進行するが周期性があり、ほとんど症状を示さない静止期とその後続く激しい急性炎症と破壊によって、歯と歯肉の間に亀裂（一般に、「歯周ポケット」と称される。）が生じ、更に、歯のまわりの結合組織が壊され、歯槽骨が吸収される。外部から観察すると、歯肉が痩せて退縮し、歯根が現れるようになって、やがては歯がぐらついて、最終的には歯が抜け落ちてしまう。

## 【0006】

ここで、現在普及している歯周病の検査診断法としては、レントゲン写真を撮って骨の吸収の度合いを目視で判断する方法、歯周ポケットの深さや細菌の付着レベルを測る方法、また、フロービング時の出血（歯周ポケットにフローブという器具を入れた時に出血があるかどうか）や歯の揺動度を調べる方法、フランク（歯垢）中の細菌数を測定し、菌の種類を同定する方法等がある。

## 【0007】

また、酵素活性測定を利用する歯周病検査方法として、口腔から採取した検体をアルカリフォスファターゼ活性測定用基質と反応させ、その発色の程度を肉眼で観察して、歯肉炎、歯周炎等の歯周疾患の程度を予測する方法（特許文献1参照）、歯肉溝 出液に含まれるコラゲナーゼの酵素活性を測定する方法（特許文献2参照）等が提案されている。

## 【0008】

## 【特許文献1】

10

20

30

40

50

特開平5-176796号公報。

【特許文献2】

特開昭61-71000号公報。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、前掲した従来の歯周病の検査診断法では、歯周病の発症を把握することはできても、病気の進行を的確に予測することは難しかった。このため、依然として、歯周病の進行を客観的に予測することができる有力な検査方法の開発が望まれている。

【0010】

自覚症状がないままに進行する歯周病への対策は、発症の早期発見と病気の進行予測が特に重要である。炎症の初期に歯槽骨の破壊の程度が予測できれば、即ち、歯槽骨破壊の早期診断ができれば、患者の早期治療への取り組みを促し、歯周病の的確な治療を行うことができる。

【0011】

そこで、本発明は、歯周病の炎症に伴って発生する歯槽骨破壊の程度を、破骨細胞を分化誘導する活性がある酵素、即ちγ-グルタミルトランスペプチダーゼの活性を調べることによって把握し、歯周病の進行予測を的確に行うことができる歯周病の検査方法及び検査診断薬を提供することを目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成して技術的課題を解決するために、本発明では、以下の手段を採用する。

【0013】

まず、本発明では、本願発明者らが、歯周病患者の歯肉溝 出液に、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ酵素（慣用名。以下「γ-GTP」と略称する。）が発現しているという事実を新規に見出したことに基づいて、このγ-GTPの活性を測定する歯周病の検査方法を提供する。

【0014】

なお、歯肉溝 出液（gingival crevicular fluid）は、歯肉に炎症が起るとその流出量が増加することが知られており、γ-GTPは、グルタチオンをはじめとするγ-グルタミルペプチドを加水分解するとともに、γ-グルタミル基を他のアミノ酸やペプチドに転移させる酵素として知られている。

【0015】

本発明において検査マーカーとして用いるγ-GTPは、現在、肝疾患等の検査診断で一般的に用いられているγ-GTP活性測定法、抗γ-GTP抗体（γ-GTPと特異的に結合する抗体）とγ-GTP蛋白質との反応を活用した直接検出法、又はPCR（polymerase chain reaction：合成酵素連鎖反応）法によってγ-GTPをコードするmRNAの発現を確認する方法等から選択される公知の手法に基づいて、簡易かつ確実に検出することが可能である。即ち、γ-GTPの検出又は測定は確立された公知の手段で簡易かつ確実に行うことができるという利点がある。

【0016】

また、本発明では、γ-GTPと反応する物質を少なくとも含有する歯周病の検査診断試薬を提供する。

【0017】

γ-GTPと反応する物質は、例えば、抗γ-GTP抗体（γ-GTPと特異的に結合する抗体）である。これによって、歯周病進行に伴う炎症によって進行する歯槽骨破壊（破骨細胞の分化誘導）のマーカーとなるγ-GTPの発現を簡便にかつ速やかに確認することが可能となる。なお、前記検査診断薬を備える歯周病の検査診断専用の検査キットも提供できる。

【0018】

以上のように、γ-GTPを歯周病のマーカーとして用いれば、歯周病の検査、診断、進

10

20

30

40

50

行予測が可能な歯周病の生化学的検査診断手法を提供できるという第1の技術的意義、そして、 $\gamma$ -GTPの測定方法又は検出方法は既に医療分野等において確立されている技術があるので、歯周病の生化学的な検査診断方法を医療分野に容易かつ迅速に普及させることができるという第2の技術的意義を有する。

【0019】

【実施例】

まず、本発明に係る歯周病の検査方法の好適な実施例としては、歯周病患者の歯肉溝 出液を患者から採取し、この歯肉溝 出液中の $\gamma$ -GTPの活性を、例えば、現在肝疾患等の検査診断で一般的に用いられている公知の $\gamma$ -GTP活性測定法によって確認する方法を挙げることができる。

10

【0020】

この測定値が高い場合には、歯周病疾患であるとの検査及び診断を行うことができる。なお、 $\gamma$ -GTP活性測定法の原理は、例えば、N-(DL- $\gamma$ -glutamyl) amino line (I) を基質にし、アクセプターとしてアミノ酸 (II) を加え、反応生成物のアソ色素を比色するというもので、市販キットを適宜利用して実施することができる。

【0021】

また、本発明では、 $\gamma$ -GTP活性が同じでも蛋白質が異なるものも存在し得ることから、抗 $\gamma$ -GTP抗体と特定の $\gamma$ -GTP蛋白質との特異的な抗原抗体反応を利用した直接検出法（免疫学的手法）によって、直接この $\gamma$ -GTP蛋白質の発現を確認し、歯周病の検査及び診断を確実に行うという実施形態を採用することもできる。

20

【0022】

ここで、 $\gamma$ -GTP蛋白質は、破骨細胞の形成活性や骨破壊との関連で発現するものが、歯周病検査のためのマーカーとして好適と考えられる。抗 $\gamma$ -GTP抗体は、この $\gamma$ -GTP蛋白質と特異的に結合するものであればよく、特に限定されない。歯周病患者から特異的に発現される特定の $\gamma$ -GTP蛋白質を直接検出することにより、歯周病の診断を確実に行うことができる。

【0023】

更には、公知のRT-PCR (Polymerase chain reaction: 合成酵素連鎖反応) 法により $\gamma$ -GTP蛋白質をコードするmRNA発現を確認する方法に基づいて、 $\gamma$ -GTPの発現を確認し、慢性関節リウマチ疾患であるとの検査及び診断を行う実施形態も採用することができる。

30

【0024】

なお、上記以外の方法でも、 $\gamma$ -GTP蛋白質を確実に検出できる方法であれば、本発明の実施例の一つとして採用できる。例えば、抗体を用いたイムノアッセイ法としては、ラジオイムノアッセイ (RIA) 並びに酵素抗体法 (ELISA)、ラジオアイソトープを使わない競合的酵素抗体法 (EIA) などを挙げることができる。また、バイオコア等のバイオセンサー装置を用いた $\gamma$ -GTP蛋白質の検出も可能である。

【0025】

次に、本発明に係る歯周病の検査診断試薬の好適な実施形態としては、例えば $\gamma$ -GTPと特異的に結合する抗 $\gamma$ -GTP抗体を少なくとも含有する構成を備える試薬が考えられる。なお、この試薬の具他の形態は広く解釈されるものであり、更には、この試薬を備える検査診断キットや抗 $\gamma$ -GTP抗体等をリガンドに備える検出表面を持つバイオセンサーチップ等も提供することができる。

40

【0026】

【実験例】

歯周病患者10名から抜歯した抜去歯を提供してもらい、この抜去歯を洗浄せずにチューブに入れて、抜去歯が浸るよう1mlの生理食塩水 (PBS) を入れて、4℃、24時間放置し、前記抜去歯に付いた歯周組織の $\gamma$ -GTPを溶出させた。その後、得られた溶出液をフィルターでろ過して滅菌し、測定用の溶出液を得た。この溶出液中の $\gamma$ -GTP活性は、協和メデックス (株) 社製・デタミナーL (登録商標) キットを用いて測定した

50

。なお、この測定は、前記溶出液 1 ml 中の 60  $\mu$ l を用いた。

【0027】

なお、比較検体は、歯周病ではない虫歯患者からの抜去歯（検体番号 11）、歯が健康で歯矯正の際に抜歯した抜去歯（検体番号 12～14）をそれぞれ用いて、上記同様の方法で  $\gamma$ -GTP 活性を測定した。測定結果を次の表 1 に示す。

【0028】

【表 1】

| 検 体       | $\gamma$ -GTP 活性 (U) |
|-----------|----------------------|
| 1         | 9.8                  |
| 2         | 15.9                 |
| 3         | 14.0                 |
| 4         | 25.3                 |
| 5         | 21.5                 |
| 6         | 15.9                 |
| 7         | 15.9                 |
| 8         | 6.1                  |
| 9         | 44.0                 |
| 10        | 10.6                 |
| 11 (比較検体) | 0                    |
| 12 (比較検体) | 0                    |
| 13 (比較検体) | 0                    |
| 14 (比較検体) | 0.7                  |

【0029】

上記表 1 に示されているように、歯周病を発症した患者 10 名（検体番号 1～10）の抜去歯の溶出液中の  $\gamma$ -GTP 活性は高く（平均 17.9 U）、一方、歯周病ではない虫歯患者からの抜去歯の溶出液（検体番号 11）の  $\gamma$ -GTP 活性は 0 であり、また、歯が健康で歯矯正の際に抜歯した抜去歯の溶出液（検体番号 12～14）においては、 $\gamma$ -GTP 活性は、平均 0.2 U であった。

【0030】

なお、上記実験例では、歯周病を発症した患者 10 名の唾液中に含まれる  $\gamma$ -GTP 活性を測定したところ、約 1 U 程度であることが確認できた。このことから、検体番号 1～10 から得られた溶出液中の  $\gamma$ -GTP の大部分は、歯肉溝 出液由来のものであることが確認できた。

【0031】

以上の実験結果から、歯周病を発症した患者の歯肉溝 出液中には $\gamma$ -GTPが発現し、その活性が高まることを検証できたことから、本発明の有効性を確認することができた。

【0032】

本発明は、歯周病の炎症に伴う歯槽骨破壊を進行させる破骨細胞の分化誘導に係わる $\gamma$ -GTPの活性を測定する方法又は同 $\gamma$ -GTPの発現を確認できる検査診断試薬であるから、歯槽骨破壊の早期発見、歯槽骨破壊の進行段階の把握、歯槽骨破壊の進行予測に役立てることができる。

【0033】

【発明の効果】

本発明によって、 $\gamma$ -GTPに関し、歯周病のマーカーとしての全く新規な用途を提案できる。そして、 $\gamma$ -GTPの測定方法又は検出方法は、既に医療分野等において確立されている技術を用いて、歯周病の生化学的な検査方法及び検査診断試薬を医療分野に容易かつ迅速に普及させることができる。更には、歯周病の決定的な生化学的検査診断技術を提供できるので、歯周病の早期診断、早期治療に役立てることができる。

【手続補正書】

【提出日】平成15年7月23日(2003.7.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

更には、公知のRT-PCR(Polymerase chain reaction: 合成酵素連鎖反応)法により $\gamma$ -GTP蛋白質をコードするmRNA発現を確認する方法に基づいて、 $\gamma$ -GTPの発現を確認し、歯周病であるとの検査及び診断を行う実施形態も採用することができる。